

DIE AUSWIRKUNGEN DER ZELLKERN-ENTFERNUNG AUF DIE SYNTHESE VON RIBONUKLEINSÄURE UND CYTOPLASMA-PROTEINEN BEI *ACETABULARIA MEDITERRANEA*

GERHARD RICHTER

Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Wilhelmshaven (Deutschland)

(Eingegangen den 26. September, 1958)

SUMMARY

*Effect of removal of nucleus on the synthesis of RNA and cytoplasmic proteins
in cells of Acetabularia mediterranea*

In growing cells of the green unicellular and uninucleate alga *Acetabularia mediterranea* exist an equal linear increase of the quantity of RNA and soluble cytoplasmic proteins. By removal of the nucleus this relation between both processes is eliminated: net synthesis of the cytoplasmic RNA fraction ceases immediately which gives rise to a constant level of RNA in enucleated cells. On the other hand the amount of cytoplasmic soluble proteins increases until 21 days after enucleation.

Enucleated fragments like anterior and posterior parts have no RNA net synthesis but they show an increase of their cytoplasmic proteins which ceases after 21 days. In nucleated fragments a strong synthesis of RNA and proteins occurs due to their ability of complete regeneration.

During a dark period of 15–16 days the quantity of RNA decreases in nucleated and enucleated cells whereas the amount of cytoplasmic proteins remains constant. Following RNA and protein synthesis during re-illumination in these cells the results are not in contrast to those which were obtained with normal cultivated nucleated and enucleated cells.

The results lead to the conclusion that the nucleus has an important role in the cytoplasmic net synthesis of RNA. But on the other hand the possibility of a nucleus independent synthesis of a small quantity of cytoplasmic RNA cannot be completely excluded.

EINLEITUNG

Zum Studium der Wirkungsweise des Zellkerns verwendet man seit längerer Zeit zwei Einzeller, deren Kerne sich leicht aus der Zelle entfernen lassen: die heterotrophe *Amoeba Proteus*, bei der einfache Durchteilung eine kernhaltige und eine kernlose Hälfte ergibt, und die zur Photosynthese befähigte *Acetabularia*, deren Kern im Rhizoid liegt und mit diesem leicht beseitigt werden kann¹. Beide Zelltypen zeigen zwar tiefgreifende Unterschiede im ihrem Stoffwechsel, dennoch sind beide in der Lage, eine Zeitlang ohne Zellkern zu existieren; *Acetabularia* zeigt darüber hinaus messbares Wachstum unter Ausbildung von Wirteln und Hüten¹.

Zur genaueren Analyse von Kernwirkungen ist es notwendig, Prozesse, von denen man annimmt, das sie nur in Anwesenheit des Zellkerns ungestört ablaufen können, auszuwählen und ihr Verhalten nach Entfernung desselben zu verfolgen. Ein wichtiger Synthesemechanismus, dessen eindeutige Lokalisation man mit Hilfe der Technik der "Merotomie" zu finden hoffte, ist die Bildung der Ribonukleinsäure in der Zelle. Ist ihre Synthese streng auf den Kern beschränkt oder gibt es darüber hinaus im Cytoplasma einen Mechanismus, der weitgehend unabhängig vom Kern arbeitet?

BRACHET *et al.*² haben Befunde mitgeteilt, wonach es in kernlosen Teilen von *Acetabularia* zu einer deutlichen Vermehrung der RNS-Fraktion kommen soll, die im Anfang sogar die Leistung der entsprechenden kernhaltigen-Zellen übertreffen könne. Die Autoren benutzten eine Adenin-Isotopenverdünnungstechnik zur Bestimmung des RNS-Gehaltes. Vorversuche am gleichen Objekt im hiesigen Laboratorium hatten jedoch hinsichtlich der RNS-Synthese in kernlosen Zellen und Teilstücken abweichende Befunde erbracht³; die Extraktion der RNS aus den Zellen erfolgte hierbei mit Perchlorsäure.

Nach Mittelung von BRACHET *et al.*² konnten diese Autoren mit der gleichen Methode keine befriedigenden Ergebnisse erzielen. Bei Anwendung der von OGUR UND ROSEN⁴ beschriebenen Versuchsanordnung, die nur leicht modifiziert wurde, gelang es jedoch im hiesigen Labor, die angegebenen Schwierigkeiten zu überwinden (s. METHODEN). Unter Verwendung derselben Methode konnte NAORA in BRACHET's Laboratorium den Befund von RICHTER³ bestätigen^{4a}.

In der vorliegenden Arbeit soll über das Verhalten von RNS- und Proteinsynthese in kernhaltigen und kernlosen ganzen Pflanzen, sowie in Teilstücken derselben berichtet werden; dabei wurde die Perchlorsäure-Extraktion angewendet.

Die ausführliche Veröffentlichung dieser Ergebnisse war zurückgestellt worden, bis ähnliche Versuche auch mit der Isotopenverdünnungsmethode (nach BRACHET *et al.*²) wiederholt werden konnten.

In gemeinsamen Versuchen, die im Institut von Prof. BRACHET in Brüssel durchgeführt wurden*, konnten NAORA UND RICHTER zeigen, dass auch bei Anwendung der Isotopenverdünnungstechnik (mit markiertem Adenin und Guanin) keine RNS-Vermehrung in kernlosen Teilen nachweisbar ist. Über diese Versuche soll an anderer Stelle berichtet werden^{4a}.

METHODEN

Versuchsmaterial

Die Untersuchungen wurden an *Acetabularia mediterranea* ausgeführt, die im hiesigen Institut nach den Angaben von HÄMMERLING⁵ und BETH⁶ kultiviert wird (in "Erdschreiberlösung" bei 12 St. Tagesbeleuchtung von 2500 Lux und bei 22°).

Kernlose Zellteile

Aus Pflanzen, die kurz vor der Hutbildung standen, wurden durch Zerschneiden mit einer Weckerschere "kernlose ganze Zellen" (durch Abtrennen des basalen Rhizoids), "Vorderstücke" und "Hinterstücke" (durch Amputation von Spitzenregion und Rhizoid) hergestellt. Bis zu ihrer Verarbeitung gemäss Versuchsanstellung

* Prof. BRACHET und seinen Mitarbeitern sei an dieser Stelle herzlich für die Bereitwilligkeit, die methodisch strittigen Fragen durch eine Zusammenarbeit zu klären, sowie für die erwiesene Gastfreundschaft gedankt.

wurden diese kernlosen Zellteile normal — wie oben beschrieben — kultiviert. Ihre Leistungen hinsichtlich Formbildung, worunter Stielwachstum, Wirtel- und Hutbildung zu verstehen sind, werden bei den Versuchsbeschreibungen vermerkt.

Für jede Versuchsreihe kam nur Material gleicher Herkunft und Anzucht zur Untersuchung.

Als Bezugsgrösse wurde die Anzahl verarbeiteter Zellen bzw. Zellteile gewählt.

Jede Versuchsreihe wurde mehrmals mit Zellen verschiedener Kulturen wiederholt; die Abbildungen geben repräsentativ das typische Ergebnis einer solchen wieder.

Extraktion der Ribonukleinsäure

Zellen bzw. Zellteile definierter Länge (s. "Ergebnisse") wurden der Nährlösung jeweils zum gleichen Zeitpunkt der Beleuchtungsperiode entnommen, zweimal in Seewasser gespült, kurz durch dest. Wasser geschwenkt und sofort in kochenden Äthylalkohol (80 %) gegeben; hierdurch sollen die meisten Enzyme inaktiviert und Substanzen, die bei der späteren spektrophotometrischen Messung durch ihre Absorption stören könnten, entfernt werden (vergl. MARKHAM⁷). Dieser Vorgang wurde nicht über drei Min. ausgedehnt.

Vergleichsweise wurden die Proben anderer Serien nur mit kaltem Alkohol (80 %) kurz vorextrahiert bzw. sofort in 70 % Alkohol + 1 % HClO_4 gegeben. Hinsichtlich der Menge extrahierbarer RNS ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede, wohl aber waren die Absorptionskurven im allgemeinen weniger typisch, wenn die Vorbehandlung mit kochendem Alkohol unterblieb.

Alle weiteren Extraktionen erfolgten nach der von OGUR UND ROSEN¹ für pflanzliche Zellen beschriebenen Methode, die nur in wenigen Punkten modifiziert wurde. 10 Min 70 % Äthylalkohol + 1 % HClO_4 bei Zimmertemp. 2 × 3 Min Kochen mit Alkohol-Äther Gemisch (3:1), Trocknen des Materials, 2 × Waschen mit kalter 0.2 N HClO_4 (4–10°), 16 Std. Extraktion mit 1.0 N HClO_4 bei 4° (2 ml). Nach 12 Std. nimmt die Menge der bei 260 $\text{m}\mu$ spezifisch absorbierenden Substanzen nicht mehr wesentlich zu (Fig. 1). Im Routineverfahren blieben die Proben über Nacht im Eisschrank; nach 16 Std. wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und durch eine feinporige Glasfritte (G_1) gesaugt. Es resultierten farblose, partikelfreie Extrakte.

u.v.-Spektrophotometrie

Die Absorption dieser Extrakte wurde im BECKMAN-Spektralphotometer (Model DU) im u.v.-Spektrum von 220–310 $\text{m}\mu$ gemessen; dabei wurden Halbrückflüssigkeitszellen aus Quarz von 1 ml Inhalt und 10 mm Schichtdicke benutzt. Es resultierten typische Absorptionskurven von (hydrolysierten) Nukleinsäuren mit einem "Trog" (trough) bei 235 $\text{m}\mu$ und einem Absorptionsmaximum (peak) bei 260 $\text{m}\mu$ (Fig. 2). Das Verhältnis von "peak" zu "trough" (E_{260}/E_{235}) betrug stets mehr als 3.5. Die geringe Absorption bei 310 $\text{m}\mu$ gibt gleichzeitig einen Hinweis auf die weitgehende Ausschaltung störender Substanzen.

Beim Vergleich paralleler Proben ergaben sich für die Absorption bei 260 $\text{m}\mu$ maximale Abweichungen von ± 10 %.

Um die Möglichkeit unvollkommener Extraktion in nicht homogenisierten Zellen nachzuprüfen, wurden Pflanzen mit kaltem Alkohol (80 %) im Homogenisator (POTTER-ELVEHJEM) zerrieben und nach kurzem Aufkochen wie oben beschrieben weiterverarbeitet. Entsprechende Mengen gleichen Materials wurden sofort in 70 %

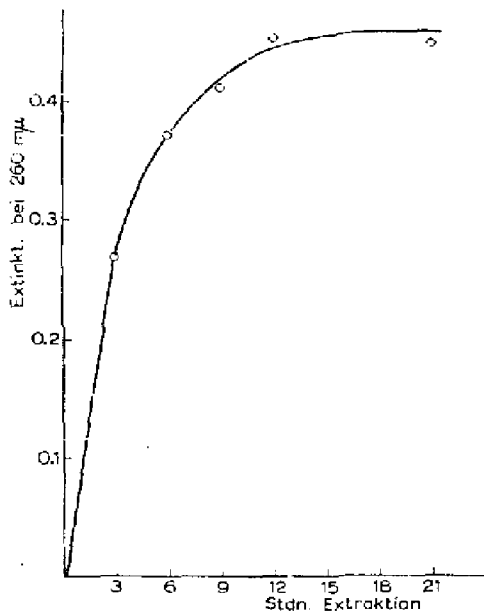


Fig. 1.

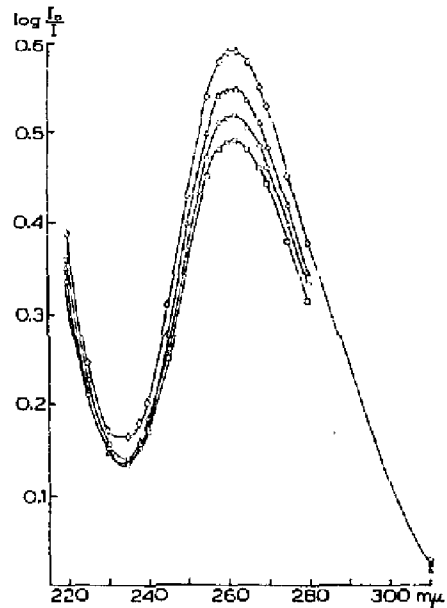


Fig. 2.

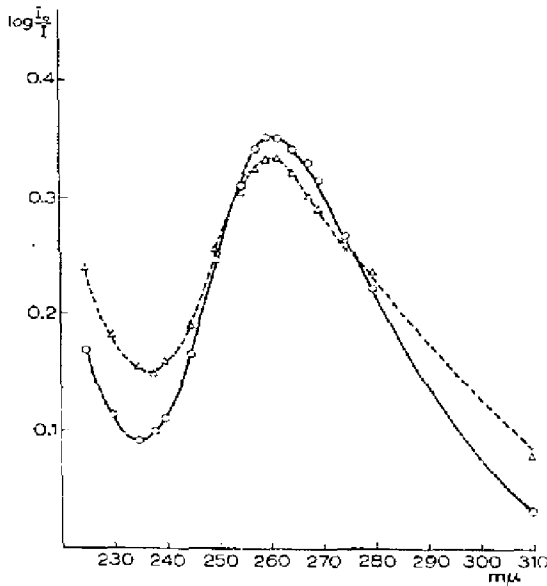


Fig. 3.

Fig. 1. Extraktion der RNS aus Zellen von *Acetabularia med.* (40) mit kalter Perchlorsäure (4°) in Abhängigkeit von der Zeit.

Fig. 2. u.v.-Absorption der aus *Acetabularia* mit kalter Perchlorsäure extrahierten RNS. 4 parallele Proben zu je 50 Zellen gleicher Herkunft, Anzucht und Grösse (40 mm, ohne Hüte) wurden nach den üblichen Vorbehandlungen (vergl. Text) 17 Std. bei 4° mit 2 ml 1.0 N HClO₄ behandelt.

Fig. 3. u.v.-Absorption der aus unzerstörten und aus homogenisierten Zellen (gestrichelte Kurve) von *Acetabularia* extrahierbaren RNS. Von Material gleicher Herkunft und Anzucht wurden 50 Zellen (30 mm, ohne Hüte) nach Homogenisierung, weitere 50 ohne Aufschluss zunächst vorbehandelt, dann mit je 2 ml 1.0 N HClO₄ über 16 Std. bei 4° extrahiert.

Alkohol + 1% HClO₄ aufgeschlossen bzw. ohne Zerreibung der Zellen in normaler Weise behandelt. Die Absorption der entsprechenden HClO₄-Extrakte bei 260 mμ war für alle Proben trotz unterschiedlicher Vorbehandlung praktisch gleich, die Ausbildung des Absorptionsminimums bei 235 mμ jedoch für die Homogenate weniger charakteristisch (Fig. 3). Auf Grund dieser Feststellung wurden alle Untersuchungen an nicht homogenisierten Zellen und Zellteilen durchgeführt.

Literatur S. 419.

Mikroskopische Kontrollen an Zellen nach den vorbereitenden Extraktionen ergaben, dass die Membranen weitgehend frei von Verunreinigungen geworden waren. Daher ist es verständlich, dass vorsichtiges Abpinseln der Pflanzen vor der Verarbeitung gegenüber unbehandelten keinen Einfluss auf die Messwerte hatte. Störungen durch Mikroorganismen, die als Verunreinigungen den Zellmembranen anhaften, konnten damit weitgehend ausgeschlossen werden.

Bei der Berechnung der RNS-Menge wurde der Phosphorgehalt im HClO_4 -Extrakt zu Grunde gelegt. Um Störungen durch Metaphosphate auszuschalten, die in *Acetabularia* gehäuft auftreten*, wurde dieses Versuchsmaterial zusätzlich über Nacht mit 10% Trichloressigsäure bei 4° behandelt; darauf folgten die oben beschriebenen Extraktionen. Aus der Extinktion pro Mol Phosphor für $260 \text{ m}\mu$ (ϵ_P nach CHARGAFF UND ZAMENHOF⁹; hier 6500⁹) konnte dann der RNS-Phosphor für jeden Extinktionswert berechnet werden; Division durch den Faktor 0.099 (SCHNEIDER¹⁰) ergab den Gehalt an RNS, der auf Einzelpflanze bzw. Teilstück bezogen wurde.

Die Phosphorbestimmung basiert auf einer kolorimetrischen Methode von WERKHEISER UND WINZLER, die von KÜHL¹¹ für die besonderen Verhältnisse bei Grünalgen modifiziert wurde; als Reduktionsmittel für den gebildeten Phosphor-Molybdat-Komplex dient Ascorbinsäure in der Hitze. Es können 1–12 μg P im ml sicher bestimmt werden.

Extraktion mit Ribonuklease

Proben anderer Versuchsserien wurden nach den üblichen Vorextraktionen (s.o.) mit RN-ase-Lösung inkubiert. Diese enthielt 0.1 mg krist. Enzym (SCHUCHARDT) pro ml Puffer; als solche dienten $M/15$ Phosphat und 0.2 N Ammoniumcarbonat-Ammoniumacetat (pH 7.6). Jede Probe wurde mit 2 ml Enzymlösung 2 Stunden bei 37° inkubiert. Nach Zentrifugieren und Filtrieren durch eine Glasfritte wurde die Absorption der Lösungen im u.v.-Licht von 220–310 $\text{m}\mu$ gemessen. Die Ausbeute an spez. bei $260 \text{ m}\mu$ absorbierender Substanz betrug etwa 80% der HClO_4 -Extrakte; ausserdem ergaben sich weniger typische Absorptionskurven als nach HClO_4 -Extraktion, da das Absorptionsminimum bei 235 $\text{m}\mu$ wesentlich schlechter ausgebildet war ($E_{260}/E_{235} < 2$).

Da diese Lösungen oft Trübungen zeigten, die selbst durch scharfes Zentrifugieren und sorgfältiges Filtrieren nicht zu beseitigen waren, wurde die Perchlorsäure als Extraktionsmedium bevorzugt.

Protein-Bestimmung

Parallel zur RNS wurde das "lösliche" Protein gemessen; unter dieser Bezeichnung sollen alle "Extrakt-Proteine" des Cytoplasmas — ausgenommen die Plastiden — verstanden werden, die nach Homogenisierung der Zellen in Puffer ($m/15$ Phosphat, pH 7.0) in Lösung gehen¹². Sie können gegen eine Fraktion der "Rückstand-Proteine" abgegrenzt werden. Ihre Bestimmung erfolgte nach der kolorimetrischen Methode von LOWRY *et al.*¹³, die dahingehend modifiziert wurde, dass sie auch bei Anwesenheit von Chlorophyll unbeeinflusst anwendbar ist¹⁴. Es können damit 10–240 μg im ml erfasst werden (Fehler $\pm 4\%$).

* $\epsilon_P = 30,98 \cdot E/c \cdot l$; ($E = \log I_0/I$; c = P-Konz. [g/l], l = Schichtdicke in cm).

ERGEBNISSE

Zuerst wurde der RNS-Gehalt und die Protein-Synthese bei normal wachsenden Pflanzen über einen Zeitraum von 35 Tagen messend verfolgt, um (1) entscheiden zu können, wann die Kernentfernung besonders erfolgversprechend ist, und um (2) eine Vergleichsmöglichkeit für die nachfolgenden Messungen an kernlosen Zellen zu haben. Als Richtgrösse dienten dabei Länge bzw. Entwicklungszustand der Pflanzen. Die Bestimmungen erfolgten alle 7 Tage, wobei jeweils 2×50 Pflanzen stets zum gleichen Zeitpunkt der Beleuchtungsperiode der Kultur entnommen wurden, um mögliche Veränderungen auf Grund des Licht-Dunkelwechsels auszuschalten.

Fig. 4 zeigt, dass bei Pflanzen, welche von durchschnittlich 12 mm auf 36 mm in 28 Tagen gewachsen waren und danach Hüte (Durchm. 3–4.5 mm) bildeten, eine deutliche Korrelation zwischen RNS-Zunahme und Vermehrung der löslichen Cytoplasma-Proteine besteht.

In den nächsten Versuchen wurde in kernlosen ganzen Pflanzen der RNS- und Proteingehalt mit entsprechenden kernhaltigen verglichen. Bei einem Teil des Versuchsmaterials gleicher Herkunft, Anzucht und Grösse (22–25 mm) wurde der Kern

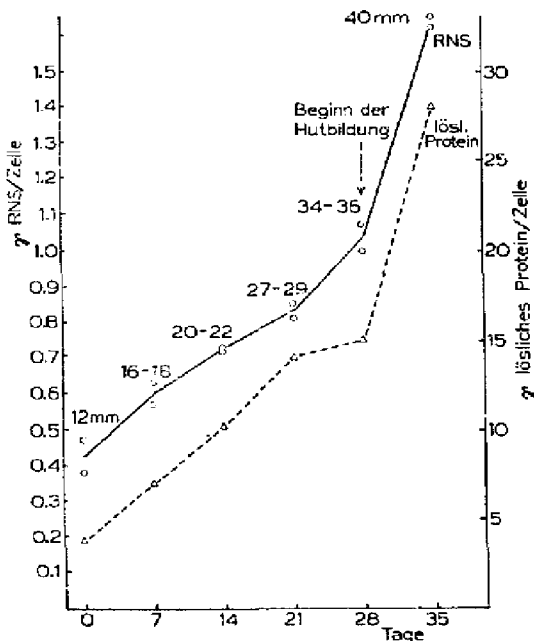


Fig. 4. Vermehrung von RNS und löslichen Proteinen bei wachsenden, kernhaltigen Zellen von *Acetabularia med.* Die Messungen erfolgten alle 7 Tage; 2×50 Zellen für RNS-, 2×30 für Protein-Bestimmung. Die Messpunkte der Proteinkurve (gestrichelt) stellen die Mittelwerte der Doppelbestimmungen dar. Die Zahlen geben die Grösse der untersuchten Zellen (in mm) an; der Beginn der Hutbildung—28 Tage nach Versuchsbeginn—ist ebenfalls vermerkt. Ordinate: μg RNS/kernhaltige Zelle bzw. μg lösliches Protein/kernhaltige Zelle.

Literatur S. 419.

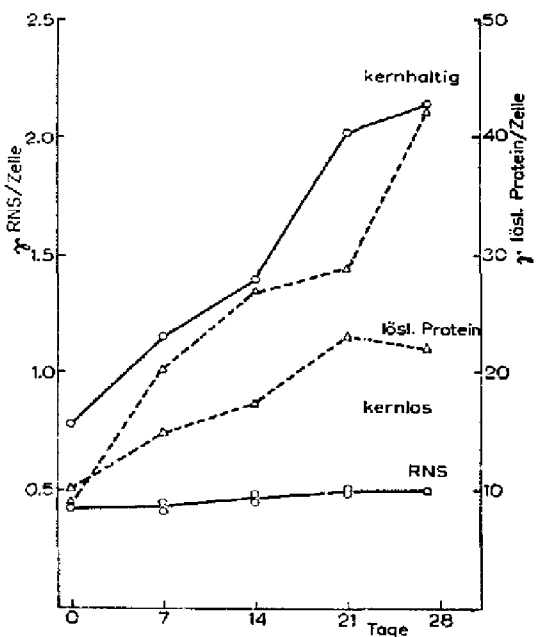


Fig. 5. Verhalten von RNS und löslichem Protein in kernhaltigen und kernlosen Zellen über 28 Tage. Probeentnahme und Messung alle 7 Tage. Länge der hutlosen Ausgangspflanzen: 22–25 mm, der daraus vor Versuchsbeginn hergestellten kernlosen Zellen: 20 mm; den kernhaltigen Vergleichszellen gleicher Kultur und Ausgangslänge wurde erst jeweils vor der RNS-Bestimmung das Rhizoid entfernt. Für diese wurden je Probe 40, zur Messung der löslichen Proteine je 20 Zellen verarbeitet.

durch Abtrennung des Rhizoids entfernt, sodass 20 mm lange kernlose Teilstücke entstanden. Diese wurden zur Erholung 24 Stunden im Dunkeln gelassen, darauf normal weiter kultiviert. Auch hier erfolgte die Entnahme des Materials im Verlauf des Versuchs immer zum gleichen Zeitpunkt der Beleuchtungsperiode.

Unmittelbar nach der Dunkelruhe wurde in 2 Proben von je 40 bzw. je 20 kernlosen Teilen der Gehalt an RNS bzw. löslichem Protein bestimmt; die erhaltenen Mengen dienten als Ausgangswerte ("Tag 0") für alle Messungen, welche auch hier im Abstand von 7 Tagen durchgeführt wurden. Parallel hierzu liefen ähnliche Bestimmungen an gleichlangen kernhaltigen Normalpflanzen derselben Kultur. Um vergleichbare Verhältnisse zu schaffen, war das Rhizoid kurz vor der Messung entfernt worden; kurzfristiges Einlegen in 96 % Alkohol erlaubt eine leichte Abtrennung ohne Substanzverlust. Ein Vergleich dieser fixierten Pflanzen mit frisch verarbeiteten ergab gleiche Mengen extrahierbarer RNS.

Es zeigte sich, dass die Entfernung des Kerns zu einer weitgehenden Sistierung der cytoplasmatischen RNS-Synthese führt (Fig. 5). Bei einigen Versuchsserien war eine leichte Zunahme des RNS-Gehaltes festzustellen, bei anderen blieb er konstant bzw. begann gegen Versuchsende sogar leicht abzusinken. Diese Abnahme war besonders für solche Zellen charakteristisch, deren Kern relativ spät, d.h. kurz vor Einsetzen der Hutbildung, entfernt worden war (s.u.). Eine gleich starke oder sogar höhere Syntheseleistung in kernlosen Zellen gegenüber kernhaltigen, wie sie von BRACHET *et al.*² angegeben wurde, konnte nicht festgestellt werden.

Die Ursachen für die unterschiedlichen Ausgangsmengen an RNS bei kernhaltigen und kernlosen ganzen Zellen, wie beispielsweise in Fig. 5 und auch bei späteren Versuchen, sind unbekannt. Man könnte zunächst daran denken, dass infolge Substanzverlust bei Abtrennung des Rhizoids der RNS-Ausgangsgehalt kernloser Teile allgemein gesenkt wurde. Bemerkenswert ist jedenfalls die Tatsache, dass bei den kernlosen Zellen oder Teilstücken der am "Tage 0" vorliegende RNS-Spiegel über den Versuchszeitraum weitgehend beibehalten wird—unabhängig davon, ob die Ausgangsmenge hoch oder niedrig—im Vergleich zu entsprechenden kernhaltigen Zellen war.

Weitere Versuche sollten darüber Aufschluss geben, ob sich ältere Pflanzen (45–60 mm) nach Kernentfernung hinsichtlich ihrer RNS- bzw. Protein-Synthese ähnlich verhalten. Die untersuchten Pflanzen hatten noch keine Hutanlagen entwickelt; durch Abtrennen des Rhizoids – wenn erforderlich mit der unteren Stielregion – wurden sie auf die einheitliche Länge von 40 mm gebracht. Die Festlegung der Ausgangswerte ("Tag 0") und die Bestimmung von RNS- und löslichem Protein erfolgten in der bereits beschriebenen Weise.

Obwohl diese Fragmente zu vollkommener Hutbildung und erheblicher Proteinvermehrung befähigt waren (vergl. dazu HÄMMERLING *et al.*¹⁵), konnte eine messbare Zunahme ihrer cytoplasmatischen RNS nicht festgestellt werden (Fig. 6).

Zerlegt man ganze Pflanzen, welche kurz vor der Hutbildung stehen, in "Vorder"- und "Hinterstücke" (vergl. "Methodischer Teil") von 12 mm Länge, so zeigen diese beiden Typen von kernlosen Zellteilen ein unterschiedliches Regenerationsverhalten: die Vorderstücke bilden neben neuem Stiel oft Hüte, die Hinterstücke dagegen kaum neuen Stiel und fast niemals Hüte^{1, 15–17}. Dagegen zeigen kernhaltige Teilstücke (Hinterstücke mit Rhizoid) vollständige Regeneration; die entstehenden Pflanzen unterscheiden sich nicht von normalen. Es erschien daher wichtig, festzustellen, ob dieses unterschiedliche Verhalten der isolierten Teilstücke auch seinen Ausdruck im

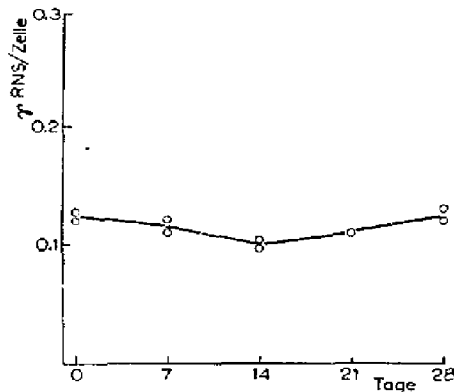


Fig. 6. Der RNS-Gehalt älterer kernloser Zellen über 28 Tage. Länge: 40 mm, hergestellt aus hutlosen, 45–60 mm langen Ausgangszellen gleicher Anzucht. 2 × 15 Zellen je Test.

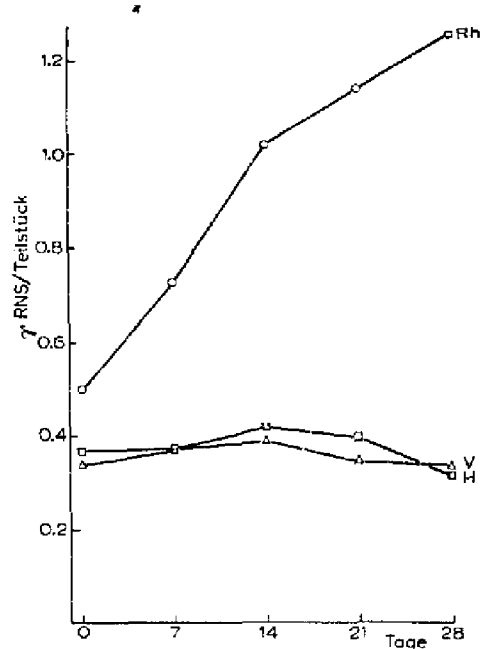


Fig. 7. RNS-Gehalt kernloser Vorder- (V) und Hinterstücke (H), sowie kernhaltiger Rhizoidteile (Rh) gleicher Stiellänge (12 mm) über 28 Tage. Länge der hutlosen Ausgangspflanzen, aus denen die Teilstücke hergestellt wurden: 26–28 mm.—40 Teilstücke je Probe.

Spiegel der RNS- und des löslichen Proteins findet und in wieweit die an kernlosen Zellen erhobenen Befunde allgemein gültig sind.

Aus Pflanzen gleicher Kultur wurden durch Zerschneiden Vorder-, Hinter- und Rhizoidstücke von 12 mm Länge gewonnen. Nach 24 stdg. Dunkelruhe wurden diese in neuer Nährlösung normal kultiviert. Sofort entnommene Proben (je 40 oder 50 Teilstücke) dienten zur Bestimmung der Ausgangswerte für RNS und lösliches Protein. Fig. 7 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs, der mehrfach mit Material aus verschiedenen Kulturen wiederholt wurde. Kernlose Vorder- und Hinterstücke zeigen demnach über einen Zeitraum von 28 Tagen keine echter Vermehrung ihrer RNS. Die kernhaltigen Rhizoidstücke dagegen haben eine gleichmässige linear ansteigende Zunahme ihrer RNS, die auf Grund der beobachteten Regenerationsleistung zu erwarten war.

Vergleicht man damit die Ergebnisse parallel durchgeführter Bestimmungen der löslichen Proteine, so ergibt sich die Tatsache, dass die Abtrennung des Kerns auf deren Synthese zunächst ohne Einfluss ist (Fig. 8), obwohl die Vermehrung der RNS-Fraktion sofort eingestellt wird. Die Zunahme der löslichen Proteine hörte in diesem Falle allerdings nach etwa 21 Tagen auf. Hingegen hatten die regenerierenden kernhaltigen Rhizoidstücke gegen Versuchsende das Fünf-fache an löslichen Proteinen gebildet. Der bekannte Befund, wonach eine begrenzte Vermehrung von Proteinen in Abwesenheit des Kernes bei *Acetabularia* stattfindet^{2, 15–18} erfährt hierdurch eine neue Bestätigung. Da dieses Problem Gegenstand eingehender Untersuchungen im hiesigen Labor ist¹⁹ soll an dieser Stelle nicht weiter auf diese Fragen eingegangen werden.

Ergänzend seien die Ergebnisse einiger Versuche beschrieben, bei denen kernhaltige und kernlose Pflanzen über einen Zeitraum von 16 Tagen im Dunkeln belassen,

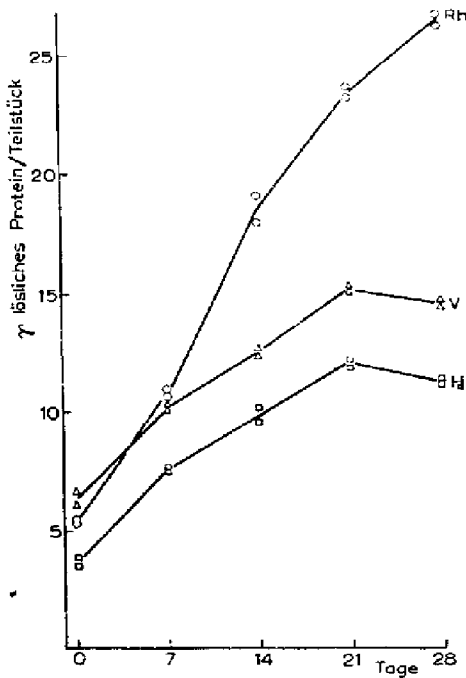


Fig. 8.

Fig. 8. Verhalten der löslichen Proteine in kernlosen Vorläufer- (V) und Hinterstücken (H), sowie in kernhaltigen Rhizoidteilen (Rh) von 12 mm Ausgangslänge über 28 Tage. Die Teilstücke wurden aus der bei Fig. 7 erwähnten Kultur hergestellt; die Pflanzen waren ebenfalls 26–28 mm gross.

Fig. 9. Wirkung einer 15- bzw. 16-tägigen Vor-Verdunkelung (schwarz umrandet) auf RNS- und Proteinsynthese frisch hergestellter kernloser Zellen, und das Verhalten beider Prozesse bei anschliessender normaler Wiederbelichtung über 20 Tage (12 Std. täglich bei ~ 2500 Lux). Zwei Serien gleichlanger, aber verschiedenen Anzuchten entstammender kernloser Zellen wurden untersucht; in Abständen von 5 bzw. 8 Tagen Entnahme von $2-3 \times 35$ Zellen zur RNS-, von 2×10 Zellen zur Proteinbestimmung. Serie 1: ausgefüllte Messpunkte (RNS ●, lösl. Protein ▲); Serie 2: offene Kreise und Dreiecke (RNS ○, lösl. Protein △). — Gestrichelte Kurve = Protein.

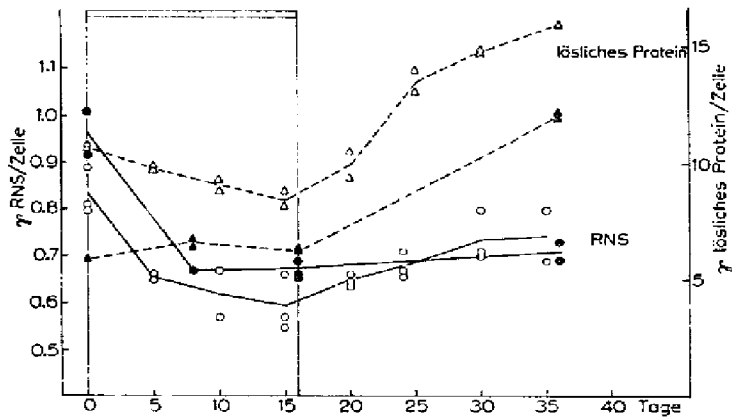


Fig. 9.

danach normal weiter kultiviert wurden. RNS- und Proteingehalt wurden in Dunkel- und Lichtzeit messend verfolgt.

Im ersten Versuch (Fig. 9) wurden zwei Serien von *kernlosen* Zellen—25 mm Ausgangslänge, ohne Hüte—nach ihrer Herstellung zunächst 15 bzw. 16 Tage dunkel gestellt, danach normal, d.h. im 12:12 stdg. Licht-Dunkel-Wechsel kultiviert. In der Dunkelperiode kommt es zu einem Abfall des RNS-Gehaltes (30 %); der dadurch erreichte Spiegel wird auch im wesentlichen in der nachfolgenden Lichtperiode beibehalten. Gleichzeitig nimmt die Menge der löslichen Proteine im Dunkeln nur geringfügig ab. Im Licht dagegen setzt eine aktive Synthese ein, die in diesem Falle bis zum 20. Tage anhält.

Hinsichtlich RNS-Gehalt und Proteinvermehrung entspricht das Verhalten dieser vorverdunkelten kernlosen Zellen solchen, die sofort nach Kernentfernung normal

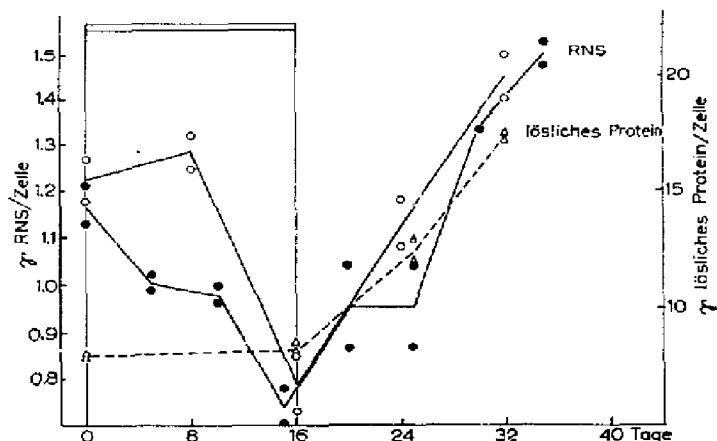


Fig. 10. Wirkung einer Dunkelzeit von 15 bzw. 16 Tagen (schwarz umrandet) auf RNS und Gehalt an löslichen Proteinen kernhaltiger Zellen, und der Einfluss anschließender normaler Wechselbelichtung über 16 bzw. 20 Tage auf beide Substanzen. Länge der Ausgangspflanzen beider Serien: 25–27 mm, hutlos. — Den für die RNS-Extraktion verwendeten Zellen war zuvor das Rhizoid entfernt worden; 30 Zellen je Probe. Über Einzelheiten der Darstellung, siehe bei Fig. 9.

kultiviert wurden; ihr Regenerationsvermögen war dagegen—wie ein Vergleich mit entsprechenden Kontrollen ergab—herabgesetzt (vergl. hierzu BRACHET *et al.*²; HÄMMERLING¹⁷). Im nächsten Experiment wurden zwei Serien *kernhaltiger* Pflanzen—25 bzw. 27 mm Ausgangslänge, ohne Hüte—den gleichen Bedingungen wie die kernlosen Zellen unterworfen. In den Proben, die zur RNS-bestimmung entnommen wurden, waren die Rhizoide vor der Extraktion entfernt worden.

Auch für die cytoplasmatische RNS-Fraktion kernhaltiger Zellen war eine Abnahme im Dunkeln feststellbar (Fig. 10), die um 35 % lag. Da die Rhizoide vor jeder Messung von den Versuchspflanzen entfernt wurden, kann in diesem Falle die Abnahme—neben einem Abbau—auch auf einer Abwanderung eines Teils derselben ins Rhizoid beruhen. Dagegen blieb der lösliche Proteingehalt unverändert. Nach Überführung in normale Kulturbedingungen zeigten diese kernhaltigen Zellen normales Wachstum, das durch eine gleichförmige Zunahme von RNS und löslichem Protein charakterisiert ist. Gegen Versuchsende—16 bzw. 20 Tage nach Beendigung der Dunkelbehandlung—waren die Pflanzen auf durchschn. 40 mm herangewachsen und hatten zu 80 % Hüte gebildet.

DISKUSSION

Bei der Analyse der Wechselbeziehungen zwischen Zellkern und Cytoplasma gilt das besondere Interesse der Frage, welche Bedeutung dem Zellkern bei der RNS-Synthese der Zelle zukommt. Hauptsächlich drei unterschiedliche Auffassungen lassen sich anhand der vorliegenden Versuchsergebnisse herausstellen: (1) alle RNS in der Zelle entstammt dem Kern, (2) die Kern-RNS stellt einen Vorläufer der cytoplasmatischen Fraktion dar, (3) die Vermehrung der cytoplasmatischen RNS oder wenigstens eines Teils derselben erfolgt unabhängig vom Zellkern im Cytoplasma selbst. Die Fülle der zum Teil voneinander abweichenden Befunde, welche mit Hilfe markierter Substanzen an tierischen kernhaltigen Zellen und durchgeteilten Amöben erhalten wurden, ist an anderer Stelle bereits zusammengefasst und diskutiert worden^{20, 21, 21a}.

Wie vorstehend gezeigt wurde, liessen sich bei *Acetabularia* die Befunde von BRACHET und Mitarbeitern² an Material der Wilhelmshavener Kulturen nicht bestätigen. Zwar konnte bei kernlosen ganzen Pflanzen in einigen Versuchsserien—30 Tage nach Kernentfernung—eine schwache Zunahme des RNS-Gehaltes um 25 % registriert werden; demgegenüber war für die meisten Versuche ein konstanter, bei wenigen sogar ein schwach absinkender RNS-Spiegel für kernlose Zellen und Zellteile charakteristisch. Ähnliches gilt, wie wiederholt sei, auch bei Anwendung der Isotopen-Verdünnungsmethode^{4a}.

Eine Erklärungsmöglichkeit der erhaltenen Versuchsergebnisse besteht darin, dass man in dem etwas schwankenden RNS-Gehalt kernloser Zellen den Ausdruck eines dynamischen Gleichgewichtes sieht, welches dadurch zustande kommt, dass möglicherweise einige Fraktionen—weitgehend kernunabhängig—vermehrt werden, während der Synthesemechanismus anderer von der Entfernung des Kernes entscheidend betroffen wird, indem bei einigen Fraktionen sogar eine allmähliche Verminderung erfolgt.

In dieser Hinsicht ergeben sich einige indirekte Hinweise, die für die Möglichkeit solcher weitgehend kernunabhängigen RNS-Fraktionen sprechen: u.v.-Bestrahlung kernloser Zellen führt zu einer starken Verminderung ihres RNS-Gehaltes, welche bis zum 11. Tage andauern kann. Nach Ausbildung einer stationären Phase war jedoch—etwa 16 Tage nach Versuchsbeginn—eine deutliche RNS-Nettosynthese messbar²². Dieser Befund stützt indirekt die Vorstellung, dass in den kernlosen Zellen und Zellteilen eine RNS-Vermehrung stattfindet; sie tritt jedoch nicht in Erscheinung, da die Gesamtmenge an cytoplasmatischer RNS infolge gleichzeitig ablaufender Abbauprozesse unverändert bleibt. Verfolgt man in kernlosen Zellen von *Acetabularia* das Verhalten der Plastiden, so lässt sich auf Grund einer Erhöhung ihres Proteingehaltes¹⁹ sowie anhand ihrer Pigmente eine deutliche Zunahme ihrer Menge feststellen²³. Die laufende Vermehrung derselben zu nachweislich funktionstüchtigen Organellen—auch die Photosyntheseleistung steigt an²—spricht dafür, dass auch der—bei *Acetabularia* noch hypothetische—RNS-Anteil der Plastiden, der bei einigen Grünalgen²⁴ und bei höheren Pflanzen mehrfach nachgewiesen wurde, synchron mit den Teilungen vermehrt wird.

Die allmählich abklingende Vermehrung der löslichen Cytoplasmaproteine erlaubt dagegen die Vermutung, dass die in ihren Synthese-Mechanismus einbezogene RNS-Fraktion von der Kernentfernung nachhaltig betroffen wird. Hier ist in erster Linie an die Mikrosomen zu denken, deren Beteiligung an der Protein-Synthese erstmalig von BRACHET und JEENER²⁵ herausgestellt und inzwischen vielfach bestätigt worden ist. Wurde diese Erkenntnis zunächst nur an tierischen Zellen gewonnen, so haben neuere Untersuchungen an Pflanzenzellen eine grundsätzliche Übereinstimmung ergeben^{26, 27}. Diese Vorstellungen müssen zunächst hypothetischer Natur bleiben, da entsprechende Untersuchungen an isolierten Zellorganellen noch ausstehen.

Die Versuchsergebnisse schliessen auch die Möglichkeit ein, dass alle RNS-Fraktionen des Cytoplasmas gleichartig von der Entfernung des Zellkernes betroffen werden, was sich in einer Sistierung der Nettosynthese manifestiert. Der schwache Anstieg des RNS-Gehaltes, wie er bei einigen Serien kernloser ganzer Pflanzen gegen Versuchsende festgestellt wurde, könnte dafür sprechen, dass dem Cytoplasma noch ein begrenzter Vorrat an "kernspezifischen RNS-Vorstufen" zur Verfügung stand, welcher eine geringe Vermehrung ermöglichte (vergl. dazu BRACHET *et al.*²). Das

würde besagen, dass die Wirkungen des Kerns auf die cytoplasmatische RNS oder zumindest auf einige Fraktionen derselben in der Lieferung spezifischer Bausteine besteht, welche beim Aufbau der RNS-Moleküle unerlässlich sind. Ob es sich dabei um eine Abgabe von Nukleoproteiden²⁸, von polymerer RNS^{21, 29, 30}, von "spezifischer RNS" im Sinne von MARSHAK³¹ oder von Nukleotiden besonderer Struktur und Funktion in das Cytoplasma handelt, bleibt weiterhin unklar. Der hohe Umsatz des Kernes von *Acetabularia* – insbesondere des Nucleolus^{32, 33} – spricht dafür, dass er ein Ort intensiver RNS-Synthese ist; schwierig hingegen ist der Nachweis zu führen, ob und in welcher Weise solcherart gebildete RNS in das Cytoplasma gelangt.

Für wachsende kernhaltige Normalpflanzen von *Acetabularia* ist eine gleichförmige Vermehrung von RNS und löslichem Protein charakteristisch, die in Abhängigkeit von Wachstum und Entwicklung abläuft. Diese Korrelation steht im Einklang mit der von CASPERSSON³⁴ und BRACHER³⁵ aufgestellten These, wonach der RNS eine entscheidende Rolle bei der Vermehrung der Proteine zukommt. Mit der Entfernung des Zellkernes wird jedoch bei *Acetabularia* die enge Kopplung beider Prozesse aufgehoben, indem bei zunächst scheinbar unbeeinflusster Proteinzunahme keine Nettosynthese von RNS in kernlosen Zellen mehr festzustellen ist. Dieser Befund würde die Auffassungen über die Beziehungen zwischen RNS- und Proteinsynthese dahingehend ergänzen, dass—zumindest bei kernlosen Zellen und Teilen von *Acetabularia*—chon die Gegenwart bzw. ein konstanter Gehalt von RNS im Cytoplasma für eine deutliche Vermehrung der löslichen Proteine—in diesem Falle bis zum 21. Tage nach Kernentfernung—ausreichend ist.

Es sei hier ergänzend vermerkt, dass auch u.v.-Bestrahlung kernhaltiger Normalpflanzen von *Acetabularia* in dieser Hinsicht einen ähnlichen Effekt wie die Kernentfernung hat, indem bei weitgehend konstantem RNS-Gehalt eine messbare Vermehrung der löslichen Proteine im Cytoplasma erfolgt²². Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass dem Zellkern ein entscheidender Einfluss bei der Synthese der RNS im Cytoplasma der *Acetabularia*-Zelle zukommt, da der überwiegende Teil derselben nur in seiner Gegenwart gebildet werden kann; möglicherweise kann ein kleiner Anteil der extranukleären RNS auch in Abwesenheit des Zellkernes über einen begrenzten Zeitraum hinweg vermehrt werden – eine experimentelle Bestätigung eines solchen Mechanismus steht jedoch noch aus. Ebenso muss die Frage, in welcher Weise der Kern die RNS-Synthese im Cytoplasma beeinflusst, unbeantwortet bleiben, zumal sich für eine cytoplasmatische RNS-Synthese bei Gegenwart des Kernes zur Zeit nur Wahrscheinlichkeitsgründe anführen lassen³⁶; sie weisen allerdings deutlicher in diese Richtung als bei Amöben^{21a}.

DANKSAGE

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, welche durch finanzielle Beihilfen die vorliegenden Untersuchungen ermöglichte, sei an dieser Stelle gedankt.

ZUSAMMENFASSUNG

Wachsende Zellen der einzelligen und einkernigen Grünalge *Acetabularia mediterranea* zeigen eine gleichmässige, linear ansteigende Zunahme ihrer RNS und ihrer löslichen Cytoplasma-Proteine. Durch Entfernung des Zellkernes wird diese Korrelation beider Prozesse in den entstehenden kernlosen Zellen aufgehoben: die Vermehrung der cytoplasmatischen RNS wird sistiert, sodass ein konstanter Gehalt resultiert; dagegen

nimmt die Menge der löslichen Proteine bis zum 21. Tage nach Kernentfernung noch zu.

Kernlose Teile wie Vorder- und Hinterstücke zeigen das gleiche Verhalten; bei konstantem RNS-Gehalt kommt es auch bei ihnen zu einer deutlichen Vermehrung der löslichen Cytoplasma-Proteine, welche nach 21 Tagen aufhört. Für kernhaltige Teile ist dagegen eine starke Zunahme von RNS und löslichen Proteinen charakteristisch, die dem starken Regenerationsvermögen dieser Fragmente entspricht.

Während einer 15–16-tägigen Dunkelzeit wird der RNS-Gehalt kernhaltiger und kernloser Zellen gesenkt; der Spiegel der löslichen Proteine bleibt konstant. Dennoch zeigt sich bei anschliessender Normalkultur kein abweichendes Verhalten hinsichtlich RNS- und Proteinsynthese im Vergleich zu nicht verdunkelten kernhaltigen und kernlosen Zellen.

Die Resultate sprechen dafür, dass dem Zellkern ein entscheidender Einfluss bei der Nettosynthese der cytoplasmatischen RNS zukommt. Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass ein kleiner Teil der extranukleären RNS auch kernunabhängig über einen begrenzten Zeitraum vermehrt werden kann.

LITERATUR

- ¹ J. HÄMMERLING, *Arch. entwicklungs Organ. Mech.*, 131 (1934) 1.
- ² J. BRACHET, H. CHANTRENNE ET F. VANDERHAEGHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 544.
- ³ G. RICHTER, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 520.
- ⁴ M. OGUR ET G. ROSEN, *Arch. Biochem.*, 25 (1950) 262.
- ^{4a} H. NAORA, G. RICHTER AND H. NAORA, *Exptl. Cell Research*, 16 (1959) 434.
- ⁵ J. HÄMMERLING, *Arch. Protistenk.*, 97 (1944) 7.
- ⁶ K. BETH, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 334.
- ⁷ R. MARKHAM, in: *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. IV (1955), Paech and Tracey ed. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg
- ⁸ H. STICH, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 36.
- ⁹ E. CHARGAFF ET S. ZAMENHOF, *J. biol. Chem.*, 73 (1948) 327.
- ¹⁰ W. C. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.*, 161 (1945) 293.
- ¹¹ A. KÜHL, *Dissertation* Marburg (Germany) 1957.
- ¹² A. T. JAGENDORF ET S. G. WILDMAN, *Plant Physiol.*, 29 (1954) 270.
- ¹³ C. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- ¹⁴ G. RICHTER, *Dissertation* Marburg (Germany) 1956.
- ¹⁵ J. HÄMMERLING, H. CLAUS, K. KECK, G. RICHTER ET G. WERZ, *Exp. Cell Research, Suppl.* 6 (1959) 210.
- ¹⁶ J. HÄMMERLING, *Intern. Rev. Cytol.*, 2 (1953) 475.
- ¹⁷ J. HÄMMERLING, 8ème Congr. Intern. de Bot., C. R. Séances et Rapp. et Commun. déposés lors du Congr. dans la Section, 10 (1957) 87.
- ¹⁸ F. VANDERHAEGHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 281.
- ¹⁹ H. CLAUS, *Planta*, 52 (1958) 334.
- ²⁰ J. BRACHET, in: *The Nucleic Acids*, Davidson and Chargaff ed. New York, Acad. Press, (1954).
- ²¹ J. BRACHET, *Biochemical Cytology*, New York, Acad. Press, (1957).
- ^{21a} W. PLANT, *Exptl. Cell Research, Suppl.* 6 (1959) 69.
- ²² G. RICHTER, *Z. Naturforsch.*, 14 b (1959), im Druck.
- ²³ G. RICHTER, *Planta*, 52 (1958) 259.
- ²⁴ K. KECK ET H. STICH, *Ann. Botany*, 21 (1957) 611.
- ²⁵ J. BRACHET ET R. JEENER, *Enzymologia*, 11 (1944) 196.
- ²⁶ M. L. STEPHENSON, K. V. THIMANN ET P. C. ZAMECNIK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1965) 194.
- ²⁷ G. C. WEBSTER, *Federation Proc.*, 15 (1956) 380.
- ²⁸ D. MAZIA ET D. M. PRESCOTT, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 23.
- ²⁹ R. JEENER ET D. SZAFARZ, *Arch. Biochem.*, 26 (1950) 54.
- ³⁰ L. GOLDSTEIN ET W. PLAUT, *Proc. Acad. Sci. Wash.*, 41 (1955) 874.
- ³¹ A. MARSHAK, *J. Cellular comp. Physiol.*, 32 (1948) 481.
- ³² H. STICH ET J. HÄMMERLING, *Z. Naturforsch.*, 8 b (1953) 329.
- ³³ J. HÄMMERLING ET H. STICH, *Z. Naturforsch.*, 11 b (1956) 158.
- ³⁴ T. CASPERSSON, *Naturwissenschaften*, 29 (1941) 33.
- ³⁵ J. BRACHET, *Arch. biol. (Liège)*, 53 (1942) 207.
- ³⁶ G. RICHTER, *Planta*, 52 (1959) 554.